

# Vitassay qPCR

## Sexually Transmitted Infections

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis* en muestras urogenitales, endocervicales y de orina.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and/or *Mycoplasma hominis* in urogenital, endocervical and urine samples.



0318\*



\*El Organismo Notificado 0318 solo interviene en la identificación de *Chlamydia Trachomatis* incluida en 7041S035A/7042S035A.

\*The Notified Body 0318 is only involved in the identification of *Chlamydia Trachomatis* included in 7041S035A/7042S035A.



## Uso previsto

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, permite la detección y diferenciación específica de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis* en muestras urogenitales, endocervicales y de orina procedentes de pacientes con signos y síntomas de enfermedad de transmisión sexual. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual.

## Referencias

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 8x8-well strip, low profile	7041035
Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 8x8-well strip, high profile	7042035
Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 16x8-well strip, low profile	7081035
Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 16x8-well strip, high profile	7082035

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S035A/ 7042S035A	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , strips low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7041S035B/ 7042S035B	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i> strips low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7C035	Sexually Transmitted Infections Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8/16 tiras de 8 tapones

## Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

### **Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado**

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

### **Resumen**

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son muy comunes y se transmiten de una persona a otra a través del contacto físico íntimo y de la actividad sexual que incluye el sexo vaginal, oral y anal. Las ETS en su mayoría pueden prevenirse al no tener relaciones sexuales. Las ETS no siempre causan síntomas, por lo que es posible tener una infección y no saberlo.

La clamidia es una infección de transmisión sexual causada por la bacteria *Chlamydia trachomatis*. La mayoría de las infecciones genitales por clamidia tanto en hombres como en mujeres son asintomáticas. Cuando se presentan síntomas, la infección del tracto urogenital inferior puede manifestarse como cervicitis en las mujeres y uretritis en los hombres y las mujeres. Ya sea sintomática o asintomática, la clamidia no tratada puede ascender al tracto genital superior. En los hombres, esto puede causar epididimitis, aunque no se cree que sea una causa importante de secuelas a largo plazo. Sin embargo, en las mujeres, la infección del tracto superior puede causar enfermedad pélvica inflamatoria (EIP), un espectro de trastornos clínicos que involucran infección e inflamación del útero, las trompas de Falopio, los ovarios o el peritoneo adyacente.

*Mycoplasma genitalium* es un patógeno de transmisión sexual que causa uretritis no gonocócica. La evidencia reciente indica que este tipo de infecciones aumenta el riesgo de cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, parto prematuro y aborto espontáneo.

*Neisseria gonorrhoeae* es un patógeno de transmisión sexual que causa infecciones en el sitio anatómico de exposición (por ejemplo, uretra, cuello uterino, faringe y recto). Las infecciones uretrales a menudo causan secreción y dolor al orinar; las infecciones cervicales, faríngeas y rectales son frecuentemente asintomáticas. En las mujeres, la gonorrea es una causa importante de enfermedad inflamatoria pélvica, que puede provocar complicaciones graves de salud reproductiva (por ejemplo, infertilidad,

embarazo ectópico y dolor pélvico crónico). Con poca frecuencia, la infección gonocócica diseminada puede causar artritis séptica localizada, endocarditis y meningitis. Las infecciones gonocócicas pueden aumentar el riesgo de transmisión sexual del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La infección por *Trichomonas vaginalis* es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más comunes en el mundo. En las mujeres afecta a la vagina y la uretra, mientras que en los hombres puede afectar a la uretra, la próstata y el epidídimo. La infección por *Trichomonas vaginalis* se ha asociado con vaginitis, cervicitis y uretritis, rotura prematura de membranas y parto prematuro en mujeres embarazadas. La infección por *Trichomonas vaginalis* también se ha asociado con un mayor riesgo de adquisición y transmisión del VIH en mujeres.

*Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* forman parte de la flora genital de hombres y mujeres y están presentes en casi el 70% de la población sexualmente activa. Estas bacterias causan inflamación y conducen a corioamnionitis, partos prematuros, y ruptura prematura de membranas.

*Mycoplasma hominis* coloniza el tracto urogenital inferior y se asocia con infecciones urogenitales, particularmente vaginosis bacteriana y uretritis no gonocócica. En adultos, se han descrito bacteriemia, artritis séptica, osteítis, endocarditis, mediastinitis, abscesos cerebrales e infecciones respiratorias. También está involucrado en infecciones genitales extra, como la fiebre posparto o posaborto, en infecciones posteriores a la cesárea o después de una histerectomía. En los recién nacidos, puede causar meningitis, abscesos cerebrales e infecciones oculares.

## Principio del test

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *T. vaginalis-specific 2-kb repeated sequence* (*Trichomonas vaginalis*), del gen *ureasa* (*Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*), gen *yidC* (*Mycoplasma hominis*), de los genes *porA* y *Opa* (*Neisseria gonorrhoeae*), una región dentro del ORF2 del plásmido clamidial (*Chlamydia trachomatis*) y del gen *MgPa adhesin* (*Mycoplasma genitalium*). Tras la extracción de DNA, la presencia de *Chlamydia trachomatis* *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis* se detecta mediante un aumento de fluorescencia durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' nucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación

espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, se trata de un test listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira (*C. trachomatis*, *M. genitalium* & *N. gonorrhoeae* ref #7041S035A/7042S035A) contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* y *Neisseria gonorrhoeae*, así como el control interno (CI). La segunda tira (*T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* & *M. hominis* ref #7041S035B/7042S035B) contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*. Tras la reacción de amplificación *Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis* se detectan en el canal FAM, *Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma parvum* se detectan en el canal ROX, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum* se detectan en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado) y *Mycoplasma hominis* y el control interno (CI) se detectan en el canal Cy5.

## Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

- Asegurarse de utilizar un pocillo para la determinación de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* y otro para la determinación de *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*. Tener cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.
- Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado Termocicladores compatibles de estas Instrucciones de uso. El resto de los equipos de PCR a tiempo real compatibles indicados en el Anexo 1 se basan en datos bibliográficos.

## Procedimiento

### Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Los especímenes clínicos (muestras urogenitales, de orina, rectales y endocervicales) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado. Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit utilizando Nextractor® NX-48 (Genolution Inc.).

MagDEA® Dx SV, utilizando magLEAD® 6gC (Precision System Science)).

NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).

NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).

STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene, Korea)

Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton, Switzerland)

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

### Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Sexually Transmitted Infections Positive Control (tubo rojo) con 200 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

### Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

### Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (*Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis*), HEX, JOE o VIC (*Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*), ROX (*Neisseria gonorrhoeae* y



*Ureaplasma parvum*) y Cy5 (Control Interno y *Mycoplasma hominis*). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada (ver Adjunto II).

## **Análisis e interpretación de resultados**

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

### **Control positivo**

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en FAM (*Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis*), HEX, JOE o VIC (*Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*), ROX (*Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma parvum*) y Cy5 (Control Interno y *Mycoplasma hominis*).

### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX, HEX y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Los resultados de la primera tira que contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* y *Neisseria gonorrhoeae* se interpretan de la siguiente manera:

- *Chlamydia trachomatis*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal FAM y un Ct menor de 40, y el control interno muestra o no señal.
- *Mycoplasma genitalium*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal HEX, JOE o VIC y un Ct menor de 40, y el control interno muestra o no señal.
- *Neisseria gonorrhoeae*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal ROX y un Ct menor de 40, y el control interno muestra o no señal.
- Si no se detecta curva de amplificación por encima del valor umbral y el control interno si la presenta, la muestra se considera negativa.

Los resultados de la segunda tira que contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis* se interpretan de la siguiente manera:

- *Trichomonas vaginalis*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal FAM y un Ct menor de 40.
- *Ureaplasma urealyticum*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal HEX, JOE o VIC y un Ct menor de 40.
- *Ureaplasma parvum*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal ROX y un Ct menor de 40.
- *Mycoplasma hominis*. Una muestra se considera positiva para este patógeno si muestra señal en el canal Cy5 y un Ct menor de 40.
- Si no se detecta curva de amplificación por encima del valor umbral, la muestra se considera negativa.

Si se detecta señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal en el control positivo, el experimento se considera fallido.

Si las muestras negativas para todos los patógenos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

## **Control de Calidad**

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI). Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

## **Características técnicas**

### **Sensibilidad y especificidad clínica**

Un total de 948 muestras (orina de primera micción, frotis rectales, frotis uretrales, frotis endocervicales/exudados, frotis vaginales y frotis faríngeos) fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections y Allplex™ STI Essential Assay (Seegene).

La primera tira de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections (*Chlamydia trachomatis* *Mycoplasma genitalium* & *Neisseria gonorrhoeae*) detectó *Chlamydia trachomatis* en 68 muestras positivas, *Mycoplasma genitalium* en 28 muestras positivas y *Neisseria gonorrhoeae* en 19 muestras positivas.

La segunda tira de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections (*Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*) detectó

*Trichomonas vaginalis* en 20 muestras positivas, *Ureaplasma urealyticum* en 166 muestras positivas, *Ureaplasma parvum* en 402 muestras positivas y *Mycoplasma hominis* en 183 muestras positivas.

Se obtuvieron 46 muestras discordantes (muestras cercanas al límite de detección). De las 46 muestras discordantes, 35 fueron confirmadas mediante otro kit de detección molecular FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics). El resto de las muestras discrepantes no se pudo volver a analizar debido a la falta de muestra.

Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections en comparación con Allplex™ STI Essential Assay (Seegene) se muestran en la siguiente tabla:

Microorganismo	SE (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>C. trachomatis</i>	97.14	99.6	95.77	99.77
<i>M. genitalium</i>	93.33	99.89	96.55	99.78
<i>N. gonorrhoeae</i>	95	99.89	95	99.79
<i>T. vaginalis</i>	100	99.68	86.96	100
<i>U. urealyticum</i>	95.95	99.23	96.51	99.1
<i>U. parvum</i>	98.77	97.6	96.87	99.06
<i>M. hominis</i>	100	99.74	98.92	100

Estos resultados muestran la elevada sensibilidad y especificidad para detectar *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis* del test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections.

### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes patógenos ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción.

### Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de las enfermedades de transmisión sexual fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes patógenos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Sexually Transmitted Infections		
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i> clase 1	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Listeria Ivanovii</i>	Cytomegalovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Virus del Herpes simple 1
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Listeria Innocua</i>	Virus del Herpes simple 2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Papillomavirus humano 16
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	Papillomavirus humano 18

### Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Chlamydia trachomatis* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Chlamydia trachomatis* (SW y LGV) cepas Swedish, Genovar F, y Serovares D, E, I, K y J, como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Mycoplasma genitalium* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Mycoplasma genitalium* como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Neisseria gonorrhoeae* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Neisseria gonorrhoeae* cepa St 49226 y Lvl Ng PorA como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Trichomonas vaginalis* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Trichomonas vaginalis* como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Ureaplasma urealyticum* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Ureaplasma urealyticum* como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Ureaplasma parvum* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Ureaplasma parvum* como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, para *Mycoplasma hominis* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Mycoplasma hominis* como molde.

## Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

## Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de las infecciones de transmisión sexual. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras urogenitales y muestras endocervicales, para *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*; muestras rectales (muestras rectales-vaginales y muestras rectales) para *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*; y muestras de orina para *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes patógenos, ya sea por muestras que contienen altas

concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

- El ON 0318 solo interviene en la evaluación de la conformidad del ensayo para *Chlamydia trachomatis*. El alcance de la certificación CE abarca la detección de *Chlamydia trachomatis* a partir de muestras de orina e hisopados urogenitales y endocervicales. La detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras faríngeas, de semen, suero e hisopados rectales, uretrales y vaginales quedan fuera del alcance de la certificación por el ON 0318. El resto de los patógenos tienen marcado CE de autocertificación.

## Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

\* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

## Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	



### Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

<b>Termociclador</b>	<b>Canal Vitassay</b>	<b>Valor de exposición</b>
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000



## Intended use

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections allows the detection and differentiation of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and/or *Mycoplasma hominis* by real-time PCR in urogenital, endocervical and urine samples from patients with signs and symptoms of sexually transmitted diseases (STDs). The product is intended for use in the diagnosis of, Sexually Transmitted Infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 8x8-well strip, low profile	7041035
Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 8x8-well strip,high profile	7042035
Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 16x8-well strip, low profile	7081035
Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections 16x8-well strip,high profile	7082035

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S035A/ 7042S035A	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> strip low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7041S035B/ 7042S035B	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i> strip low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7C035	Sexually Transmitted Infections Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8/16 x 8 cap strip

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.

- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

### **Additional equipment and material required**

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

### **Summary**

Sexually transmitted diseases (STDs) are very common and are transmitted from one person to another through intimate physical contact and sexual activity that includes vaginal, oral, and anal sex. STDs can mostly be prevented by not having sex. STDs do not always cause symptoms, so it is possible to have an infection and not know it.

Chlamydia, a sexually transmitted infection is caused by the bacterium *Chlamydia trachomatis*. The majority of genital chlamydial infections in both males and females are asymptomatic. When symptoms do occur, lower urogenital tract infection can manifest as cervicitis in females and urethritis in males and females. Whether symptomatic or asymptomatic, untreated chlamydia can ascend to the upper genital tract. In males, this can cause epididymitis, which is not thought to be an important cause of long-term sequelae. However, in females, upper tract infection can result in pelvic inflammatory disease (PID), a spectrum of clinical disorders involving infection and inflammation of the uterus, fallopian tubes, ovaries, or adjacent peritoneum.

*Mycoplasma genitalium* is a sexually transmitted pathogen that causes no gonococcal urethritis, and recent evidence indicates that it increases the risk for cervicitis, pelvic inflammatory disease, preterm delivery, and spontaneous abortion.

*Neisseria gonorrhoeae* is a sexually transmitted pathogen that causes infections at the anatomic site of exposure (e.g., urethra, cervix, pharynx, and rectum). Urethral infections often cause discharge and pain with urination; cervical, pharyngeal, and rectal infections are frequently asymptomatic. In women, gonorrhoea is a major cause of pelvic inflammatory disease, which can lead to severe reproductive health complications (e.g., infertility, ectopic pregnancy, and chronic pelvic pain). Infrequently, disseminated gonococcal infection can result in localized septic arthritis, endocarditis, and meningitis.

Gonococcal infections can increase the risk for sexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV).

*Trichomonas vaginalis* infection is one of the most common sexually transmitted diseases (STDs) in the world. In women it can be found in the vagina and in the urethra, while in men it can be found in the urethra, the prostate, and the epididymis. *Trichomonas vaginalis* infection has been associated with vaginitis, cervicitis and urethritis, premature rupture of membranes and premature delivery in pregnant women. *Trichomonas vaginalis* infection has also been associated with an increased risk of HIV acquisition and transmission in women.

*Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are part of the genital flora of men and women and are present in almost 70% of sexually active population. These bacteria cause inflammation and lead to chorioamnionitis, preterm deliveries, and premature rupture of membranes.

*Mycoplasma hominis* colonizes the lower urogenital tract and is associated with urogenital infections, particularly bacterial vaginosis, and non-gonococcal urethritis. In adults, bacteremia, septic arthritis, osteitis, endocarditis, mediastinitis, brain abscesses and respiratory infections have been described. It is also involved in extra genital infections, such as postpartum or post-abortion fever, in post-cesarean wound infections or after a hysterectomy. In neonates, it can cause meningitis, brain abscesses and eye infections.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *T. vaginalis*-specific 2-kb repeated sequence gene (*Trichomonas vaginalis*), *ureasa* gene (*Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*), *yidC* gene (*Mycoplasma hominis*), *porA* and *Opa* genes (*Neisseria gonorrhoeae*), a region within ORF2 of the chlamydial plasmid (*Chlamydia trachomatis*) and *MgPa adhesin* gene (*Mycoplasma genitalium*). It is detected by an increment in the fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' nuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip

(*C. trachomatis*, *M. genitalium* & *N. gonorrhoeae* ref #7041S035/7042S035) contains the multiplex reaction mix for the detection of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Neisseria gonorrhoeae* as well as the internal control (IC). The second strip (*T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* & *M. hominis* ref #7041S035B/7042S035B) contains the multiplex reaction mix for the detection of *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*. *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis* DNA targets are amplified and detected in FAM channel, *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma parvum* DNA targets are amplified and detected in ROX channel, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* DNA targets are amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2) and *Mycoplasma hominis* and the internal control (IC) DNA targets are amplified and detected in Cy5 channel.

## Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for determining *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* and another well for determining *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*. Be careful not to mix them throughout the process.

- Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections has only been validated with the equipment mentioned in Section Compatibles real-time PCR equipment of these Instructions for Use. The rest of the compatible Real Time PCR instrument indicated in Annex 1 is based on bibliographic data.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing, and DNA extraction**

Clinical specimens (urogenital specimens, urine samples, rectal and endocervical samples) should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend using fresh samples.

For longer storage, the samples should be frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenize sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nextractor® NX-48 (Genolution Inc.).

MagDEA® Dx SV, using magLEAD® 6gC (Precision System Science)).

NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).

NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).

STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene, Korea)

Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton, Switzerland)

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

## Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Sexually Transmitted Infections Positive Control (red tube) with 200 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

## Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

## Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (*Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis*), HEX, JOE o VIC (*Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*), ROX (*Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma parvum*) and Cy5 (Internal Control (IC) and *Mycoplasma hominis*). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).



## Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

### Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (*Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis*), HEX, JOE or VIC (*Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*), ROX (*Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma parvum*) and Cy5 (Internal Control and *Mycoplasma hominis*), which validates the reaction.

### Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX, HEX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The results of the first strip containing the multiplex reaction mixture for the detection of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Neisseria gonorrhoeae* are interpreted as follows:

- *Chlamydia trachomatis*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the FAM channel and a Ct less than 40, and the internal control shows or not a signal.
- *Mycoplasma genitalium*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the HEX, JOE or VIC channel and a Ct less than 40, and the internal control shows or not a signal.
- *Neisseria gonorrhoeae*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the ROX channel and a Ct less than 40, and the internal control shows or not a signal.
- If no amplification curve is detected above the threshold value and the internal control is present, the sample is considered negative.

The results of the second strip containing the multiplex reaction mixture for the detection of *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* are interpreted as follows:

- *Trichomonas vaginalis*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the FAM channel and a Ct less than 40.
- *Ureaplasma urealyticum*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the HEX, JOE or VIC channel and a Ct less than 40.
- *Ureaplasma parvum*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the ROX channel and a Ct less than 40.
- *Mycoplasma hominis*. A sample is considered positive for this pathogen if it shows a signal in the Cy5 channel and a Ct less than 40.
- If no amplification curve is detected above the threshold value, the sample is considered negative.

If amplification signal is detected in the negative control and / or no signal is present in the positive control, the experiment is considered unsuccessful.

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction must be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

## Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

## Performance evaluation

### Clinical sensitivity and specificity

A total of 948 samples (first-void urines, rectal swabs, urethral swabs, endocervical swabs/exudate, vaginal swabs and pharyngeal swabs) were analysed by Vitassay strip qPCR Sexually Transmitted Infections and Allplex™ STI Essential Assay (Seegene).

The first Vitassay strip qPCR Sexually Transmitted Infections (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Neisseria gonorrhoeae*) detected *Chlamydia trachomatis* in 68 positive samples, *Mycoplasma genitalium* in 28 positive sample and *Neisseria gonorrhoeae* in 19 positive samples.

The second Vitassay strip qPCR Sexually Transmitted Infections (*Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*) detected *Trichomonas vaginalis* in 20 positive samples, *Ureaplasma urealyticum* in 166 positive samples, *Ureaplasma parvum* in 402 positive samples and *Mycoplasma hominis* in 183 positive samples.

46 discordant samples were obtained (samples close to the detection limit). Of the 46 discordant samples, 35 were confirmed by another molecular detection kit FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics). The remaining discrepant samples cannot be re-analysed due to lack of sample.

Sensitivity, specificity, PPV and NPV values for Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections compared with Allplex™ STI Essential Assay (Seegene) are shown in next table:

Microorganism	SE (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)
<i>C. trachomatis</i>	97.14	99.6	95.77	99.77
<i>M. genitalium</i>	93.33	99.89	96.55	99.78
<i>N. gonorrhoeae</i>	95	99.89	95	99.79
<i>T. vaginalis</i>	100	99.68	86.96	100
<i>U. urealyticum</i>	95.95	99.23	96.51	99.1
<i>U. parvum</i>	98.77	97.6	96.87	99.06
<i>M. hominis</i>	100	99.74	98.92	100

These results show the high sensitivity and specificity to detect *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections.

### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of the template DNA of the different pathogens ( $10^7$ - $10^1$  copies / reaction). This assay has a limit of detection of  $\geq 10$  copies of DNA per reaction.

### Analytical specificity

The analytical specificity for Sexually Transmitted Infections was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Sexually Transmitted Infections		
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i> class 1	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Listeria Ivanovii</i>	Cytomegalovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Herpes simplex virus 1
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Listeria Innocua</i>	Herpes simplex virus 2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Human Papillomavirus 16
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	Human Papillomavirus 18

### Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Chlamydia trachomatis* was confirmed by the real time amplification using *Chlamydia trachomatis* (SW and LGV), Swedish strain, and Genovar F, and Serovars D, E, I, K and J, as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Mycoplasma genitalium* was confirmed by the real time amplification using *Mycoplasma genitalium* as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Neisseria gonorrhoeae* was confirmed by the real time amplification using *Neisseria gonorrhoeae* strains St 49226 and Lvl Ng PorA, as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Trichomonas vaginalis* was confirmed by the real time amplification using *Trichomonas vaginalis* as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Ureaplasma urealyticum* was confirmed by the real time amplification using *Ureaplasma urealyticum* as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Ureaplasma parvum* was confirmed by the real time amplification using *Ureaplasma parvum* as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections for *Mycoplasma hominis* was confirmed by the real time amplification using *Mycoplasma hominis* as template.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Sexually Transmitted Infections has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler® tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Sexually Transmitted Infections. All results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with urogenital specimens and endocervical specimens for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*, rectal specimens (rectal-vaginal specimens and rectal samples) for *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*; and urine samples for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positives due to cross-contamination with different pathogens, either by samples containing high concentrations of target template DNA or by carryover contamination from PCR products from previous reactions

- ON 0318 only intervenes in the conformity assessment of the test for *Chlamydia trachomatis*. The scope of the CE certification covers the detection of *Chlamydia trachomatis* from urine samples and urogenital and endocervical swabs. The detection of *Chlamydia trachomatis* in pharyngeal, semen, serum and rectal, urethral and vaginal swabs are out of the scope of certification by ON 0318. The rest of the pathogens have self-certification for CE marking.

## Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

\* See Attached III to configure exposure settings.

## Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	



### Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Bibliography/Bibliografía

1. G. Kusdian et al. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology Journal* (2015).
2. F. Kazumasa et al. Rapid and simple detection of *Ureaplasma* species from vaginal swab samples using a loop-mediated isothermal amplification method. *American Journal of Reproductive Immunology* 2017; e12771.
3. CDC Grand Rounds: Chlamydia prevention: challenges and strategies for reducing disease burden and sequelae. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.
4. D. Férandon et al. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17(2): 155-159.
5. JB. Slifirski et al. *Mycoplasma genitalium* Infection in Adults Reporting Sexual Contact with Infected Partners, Australia, 2008–2016. *Emerging Infectious Diseases*. 2017;23(11):1826-1833.
6. RD. Kirkcaldy et al. *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility Surveillance. The Gonococcal Isolate Surveillance Project, 27 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 2016;65(No. SS-7):1–19.
7. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>
8. <https://www.cdc.gov/std/>

## Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.











Mx3000P™ and Mx3005™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

## Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For <i>in vitro</i> diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
	Identificación única de dispositivo Unique Device Identification		Número de referencia Catalogue number



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa  
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)